UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1944-1945. — N° 99

ESSAI BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FOIE INJECTABLES SUR LE LAPIN EN ÉTAT D'ANÉMIE SATURNINE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 4 Mai 1945

PAR

Anne-Marie-Catherine JENSEN, née HUDLET

Née à COGNAC (Charente), le 16 mars 1920

Examinateurs de la Thèse :

MM. DAMADE, professeur ..... *Président*

BONNIN, professeur ..... *Juges.*

BROUSTET, agrégé ..... *Juges.*

SARIC, agrégé ..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1945

JENSEN (Anne-Marie-Catherine), née **HUDLET**

Essai biologique des extraits de foie injectables sur le lapin en état d'anémie saturnine. — Bordeaux, Delmas, 1945. In-8°, 43 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1944-1945. N° 99.*)

JENSEN (Anne-Marie-Catherine), née **HUDLET**

Essai biologique des extraits de foie injectables sur le lapin en état d'anémie saturnine. — Bordeaux, Delmas, 1945. In-8°, 43 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1944-1945. N° 99.*)

JENSEN (Anne-Marie-Catherine), née **HUDLET**

Essai biologique des extraits de foie injectables sur le lapin en état d'anémie saturnine. — Bordeaux, Delmas, 1945. In-8°, 43 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1944-1945. N° 99.*)

JENSEN (Anne-Marie-Catherine), née **HUDLET**

Essai biologique des extraits de foie injectables sur le lapin en état d'anémie saturnine. — Bordeaux, Delmas, 1945. In-8°, 43 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1944-1945. N° 99.*)

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1944-1945. — N° 99

ESSAI BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FOIE INJECTABLES SUR LE LAPIN EN ÉTAT D'ANÉMIE SATURNINE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 4 Mai 1945

PAR

Anne-Marie-Catherine JENSEN, née HUDLET

Née à COGNAC (Charente), le 16 mars 1920

Examinateurs de la Thèse :

MM. DAMADE, professeur ..... *Président*

BONNIN, professeur .....

BROUSTET, agrégé ..... *Juges.*

SARIC, agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1945

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. DUPÉRIÉ.

ASSESSEUR : M. LABAT.

PROFESSEURS HONORAIRES :

M. DENIGÈS, BEILLE, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	N.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	N.
Clinique chirurg. et gynécol.	JEANNENEY.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	LOUBAT.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Clin. des maladies infectieuses	DAMADE.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DE GRAILLY.	Chimie biologique et médicale	MACHEBOEUF.
Anatomie	VILLEMIN.	Physique méd. et pharmaceutique.	N.
Anatomie générale et histologie.	G. DUBREUIL.	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN.
Hygiène	LEURET.	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA.
Médecine légale et déontologie	DERVILLÉE.	Clin. des mal. des voies urinaires.	DARGET.
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	RÉCHOU.	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET.
Chimie	CHELLE.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	N.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Toxicologie et hygiène appliquée.	LABAT.
Pharmacie	VITTE	Hydrologie thérap. et climatol.	CREYX.
Physiologie	FABRE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Clin. méd. des mal. des enfants.	FONTAN.		

PÉRY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). CHARRIER (Chirurgie générale). FAUGÈRE (Obstétrique).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	POUYANNE.
Physiologie	FRANCK.	Obstétrique	N.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	id.	MAHON.
id.	N.	Ophtalmologie	N.
id.	N.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	BROUSTET.	Dermatologie et syphiligraphie	N...
id.	N.	Physique médicale	N...
id.	SARIC.	Chimie gén. pharm. et toxicol.	CASTAGNOU.
id.	DUBARRY.	Histoire natur. pharmaceutique	GIRARD.
Chirurgie générale	N.	Pharmacie	MESNARD.
id.	MASSÉ.	id.	N.
id.	N.	Histoire natur. méd. et parasitol.	R. MANDOUL.
id.	MAGENDIE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	MASSÉ.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Accouchements	MAHON.	Botanique	GIRARD.
Puériculture	FAUGÈRE.	Cryptogamie	GIRARD.
Zoologie et parasitologie	R. MANDOUL.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	N...	Bactériologie	MOUREAU.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	Mlle ROUGIER.
Ophtalmologie	N.	Chimie biologique	TAYEAU
Anatomie	J. BEAUVIEUX	Parasitologie et biologie appliqu.	PAUTRIZEL.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON MARI

A MES PARENTS

A MES SŒURS ET FRERE

A MES GRAND-MERES

A MES BEAUX-PARENTS

MEIS ET AMICIS

A MES MAITRES DE LA FACULTE

A MES MAITRES DES HOPITAUX

STAGE :

1938-1939. Monsieur le Docteur CHARBONNEL
Monsieur le Docteur DUBOURG

1939-1940. Monsieur le Professeur CARLES

1940-1941 Monsieur le Docteur AUGISTROU
Monsieur le Docteur DARMAILLACQ

EXTERNE :

1941-1942. Monsieur le Docteur BOISSERIE-LACROIX
Monsieur le Professeur AUBERTIN
Monsieur le Docteur LAFARGUE

1942-1943. Monsieur le Docteur DUBOURG

EXTERNE EN PREMIER :

1943-1944. Monsieur le Docteur SERVANTIE

C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons à chacun d'eux nos remerciements respectueux pour l'enseignement patient et éclairé qu'ils nous ont donné auprès des malades.

1940-1941. Monsieur le Doeteur AUGISTROU

A Monsieur le Docteur SERVANTIE

Biologiste des hôpitaux,
Chef de laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Docteur de l'Université de Bordeaux, mention « Pharmacie »,
Croix de guerre.

Dont nous avons eu l'honneur d'être l'interne pendant une année. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre tout particulier attachement pour l'intérêt et la bonté qu'il nous a témoignés, pour l'enseignement qu'il nous a permis d'acquérir au Laboratoire, pour cette thèse enfin qu'il a bien voulu inspirer.

A Monsieur le Docteur E. DUBOURG

Médecin des hôpitaux.

Dans le service duquel nous avons pu exercer les fonctions d'externe après y avoir été stagiaire. Nous y avons reçu les plus claires et les plus riches leçons de nos études médicales. Puissiez-vous voir ici, cher Monsieur, un signe de gratitude pour cet enseignement et la bienveillance dont vous avez toujours fait preuve à notre égard.

A Monsieur le Professeur agrégé P. BROUSTET

Médecin des hôpitaux.

A Monsieur le Professeur agrégé SARIC

Médecin des hôpitaux.

A Monsieur le Professeur BONNIN

Professeur de Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques,
Médecin des hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

En double remerciement de leur enseignement à la Faculté, et de l'honneur qu'ils nous font de bien vouloir faire partie du jury de cette thèse.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DAMADE

Professeur de Clinique des maladies infectieuses.
Médecin des hôpitaux.
Médaille d'argent des Epidémies,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier d'Académie.

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
En hommage respectueux.

ESSAI BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FOIE

INJECTABLES SUR LE LAPIN

EN ÉTAT D'ANÉMIE SATURNINE

AVANT-PROPOS

Après avoir lu le livre si précieux de J. Cheymol sur les *Médicaments antianémiques et anémies expérimentales*, on arrive à une double conclusion négative. Les essais sur l'animal apparaissent décevants avec une timide réserve pour l'anémie au plomb et l'anémie saponine-collargol. Quant aux essais sur le biermérien reconnus comme officiels par la pharmacopée américaine en 1936, l'auteur termine ainsi son exposé : « Cette méthode donne une garantie au médecin et au malade, mais elle n'est pas sans inconvénients. Sans parler du fait de ramener le biermérien au rôle decobaye, il est difficile de trouver des patients convenables non traités pour faire les essais. De plus, elle permet difficilement les recherches nouvelles des laboratoires et de l'industrie. »

Comme Interne en médecine au Laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André, nous avons suivi les essais pratiqués sur le biermérien par les Docteurs P. Broustet, L. Servantie et A. Baron pour le titrage en unités antianémiques d'un extrait de foie injectable préparé en France (Hépagyl). Ces recherches ont été exposées par P. Serieys en mai 1944 dans sa thèse de médecine.

Devant les difficultés de l'expérimentation sur l'homme,

il apparaissait indispensable de reprendre l'expérimentation sur l'animal. L'urgence se faisait d'autant plus sentir que, durant la période de guerre, certains extraits paraissaient ne plus avoir l'activité qui leur était reconnue antérieurement.

Avec le Docteur Servantie, nous avons été aiguillés sur les travaux de Mme Lourau, dont les publications, parues en 1943 et en 1944 à la Société de chimie biologique, semblaient donner la solution aux questions que nous nous étions posées :

1° Rechercher un test biologique qui permettrait au point de vue qualitatif de classer les extraits injectables de foie en produits actifs et inactifs;

2° Contrôler ce test biologique pour en saisir les modalités et en vérifier la valeur qualitative et quantitative.

Nos recherches ont connu la période la plus critique de la guerre, où animaux et hommes ont souffert ensemble de dures conditions alimentaires. Nous avons eu un matériel animal tout différent de celui qui doit être exigé dans de semblables recherches. Les circonstances nous ont obligé à terminer notre expérimentation plus rapidement que nous l'aurions désiré.

Quoi qu'il en soit, nous exposerons notre technique et nos résultats en regrettant qu'ils ne puissent fournir une conclusion irréfutable.

Nous ne saurions trop remercier le Docteur Servantie du soin qu'il a mis à nous guider dans ce travail après nous l'avoir inspiré.

Que Sœur Anne-Marie et Mlle Saint-Laurent, du Laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André, dont l'assistance et la collaboration nous ont été si précieuses, veuillent bien trouver ici l'expression de notre bien sincère reconnaissance.

INTRODUCTION

Lorsqu'en 1920 Whipple entreprit avec Robscheit-Robbins de créer chez l'animal des anémies expérimentales pour étudier ensuite les meilleurs moyens de les guérir, la thérapeutique antianémique allait bénéficier de la découverte de l'opothérapie hépatique, et entrer dans cette voie nouvelle dont elle ne devait plus s'écarter, et connaître dans le monde entier un essor considérable. Les résultats de ces travaux de l'école américaine d'Harvart (Minot, Murphy, Fitz et Munroë) ne devaient paraître que cinq ans plus tard; mais, dès lors, la maladie de Biermer, cette « anémie gravissime, progressive avec oscillations » dont parle Chevallier, voyait se transformer son évolution et son pronostic grâce à une thérapeutique qui paraît bien avoir la valeur d'une médication spécifique : l'opothérapie hépatique. En effet, à peine dégagée du cadre des anémies banales (secondaires ou primitives) par Biermer en 1868, qui la décrivit pour la première fois comme une anémie pernicieuse, progressive, cryptogénétique ou mieux, d'après l'image sanguine, comme l'anémie hyperchrome, mégaloblastique, cette affection ne devait pas, quant à la thérapeutique, se différencier encore du groupe confus des anémies en général. C'est ainsi que lui furent appliqués les médicaments antianémiques en usage à ce moment-là : on utilisa d'abord le rôle hématopoïétique du fer, auquel se joignent bientôt le cuivre et le manganèse, catalyseurs de son action. Il était normal, en effet, de penser en premier lieu à fournir à l'organisme les éléments constitutifs de l'hémoglobine :

« De tous temps, disent Damade et Léger, l'idée dominante dans le traitement des anémies avait été de subvenir à l'insuffisance numérique des globules rouges par l'introduction

dans l'organisme des substances constitutives des hématies. Les médications à base d'hémoglobine, de fer, de cuivre, de manganèse, ainsi que les transfusions, ont représenté les méthodes attachées à ce principe et sont longtemps demeurées seules à l'honneur. »

Avant d'en arriver à la découverte de l'opothérapie, il faut signaler, dans cette voie de la recherche des principes constitutifs de l'hémoglobine, les noms de deux Français, Fontès et Thivolle, qui recherchèrent les acides aminés spécifiques indispensables à l'hématopoïèse : le tryptophane et l'histidine.

Mais en présence des troubles profonds constatés au niveau des organes hémoformateurs, en particulier de la moelle osseuse, l'idée de suppléer à ces organes déficients par l'opothérapie naquit, et fut pratiquée sous forme d'extraits de moelle osseuse, d'extraits spléniques, puis de transfusions sanguines, enfin d'emploi de sérum de cheval soumis à des saignées répétées.

A l'heure actuelle, tout en étant toujours utilisables, ces facteurs ne peuvent plus être que des adjuvants dans le traitement de l'affection qui nous occupe.

C'est donc en étudiant la régénération sanguine dans l'anémie posthémorragique du chien, au moyen de régimes alimentaires soigneusement préparés à partir d'une « ration basale », que Whipple en vint à la constatation qu'il consigna de cette manière encore tout empirique : « L'alimentation avec le foie de bœuf est l'agent le plus puissant de régénération de l'hémoglobine et des globules rouges. »

C'est Minot qui, peu après, appliqua cette conclusion à la clinique humaine et constata que l'administration de foie total de bœuf avait entraîné la régénération sanguine au cours de l'anémie pernicieuse.

On sait alors par quelles phases « héroïques » passèrent les différents modes d'administration du foie aux biermériens : Minot et Murphy ne faisaient pas ingérer moins de 500 grammes de foie de veau frais à leurs malades par jour.

Mais en présence des difficultés matérielles d'une telle médication on en vint tout naturellement à procéder à la fabrication d'extraits : extraits aqueux d'abord, puis extraits alcooliques à propos desquels il faut signaler la préparation ordinairement appelée « fraction G » de Cohn et Minot obtenue par une série de précipitations, et à partir de laquelle on fabrique encore bien des extraits injectables. Enfin, des extraits secs furent fabriqués et administrés aussi par voie buccale. Toutes ces préparations, qui restaient d'un emploi difficile, et désagréable pour le malade, imposèrent l'idée d'une purification de ces extraits dans le but de diminuer la quantité considérable d'extrait hépatique, et d'apporter seulement au malade le principe actif, le principe « antipernicieux » qui, obtenu à l'état de pureté sous un volume réduit, serait suffisant pour que s'effectue normalement l'hématopoïèse et la régénération globulaire. Ce problème est encore en suspens, au point qu'actuellement beaucoup de cliniciens préfèrent encore les extraits bruts pouvant contenir des facteurs non identifiés à ces extraits trop purifiés. La « fraction G » de Cohn demeure, tant que l'identification chimique du principe antipernicieux n'aura pas été plus poussée, la forme sous laquelle le produit est doué de la plus grande activité. Sa concentration et sa purification pourraient être suffisantes pour rendre le traitement d'un prix et d'une posologie satisfaisants (anémies pernicieuses avec troubles médullaires).

Cependant il semble démontré que le principe actif est constitué d'une substance relativement thermostabile, hydrosoluble, précipitable par l'alcool, et dont la formule rappellerait d'après Cohn soit un polypeptide, ou plutôt une base azotée secondaire ou tertiaire, peut-être hétérocyclique de poids moléculaire compris entre 5.000 et 10.000.

Mais le progrès décisif consiste dans la substitution de la voie parentérale à la voie buccale dans l'administration des extraits purifiés permettant un traitement soigneusement dosé et une indiscutable économie de matière première.

Duesberg, Stieger et Félix obtinrent un produit assez pur pour être injecté dans les muscles, et très concentré puisque 1 centigramme correspondrait à 15 grammes de foie frais.

Gausslen, en 1930, en Allemagne, prépare un extrait hématopoïétique de foie désalbuminé et délipoïdé susceptible d'être injecté.

Enfin, Castle, à partir de la fraction G, obtient un des produits injectables les plus actifs.

En effet, les extraits hépatiques sont beaucoup plus actifs par voie parentérale que par administration buccale, et tandis qu'il était nécessaire de manger 500 grammes de foie par jour pour obtenir l'amélioration de l'image sanguine et des lésions médullaires, une simple injection parentérale d'extrait obtenu à partir de 10 ou 20 grammes suffit à obtenir le même résultat. Ces solutions peuvent être administrées par voie intraveineuse ou intramusculaire; dans tout autre tissu, l'injection de grandes quantités cause des réactions locales suivies de nécrose. Pour l'usage intraveineux, le produit a été purifié par absorption sur la permutite afin d'éliminer l'histamine et les dérivés de la choline contenus dans le foie. Cette voie, d'ailleurs, n'est utilisée qu'exceptionnellement.

Davidson, en 1932, utilisant ce genre d'extrait, le trouve cent fois plus actif que le foie cru absorbé aux doses correspondantes. C'est qu'en effet le principe antipernicieux doit être en partie détruit au court du trajet gastro-intestinal, et que, d'autre part, l'achylie du biermérien ne lui permet pas de détruire suffisamment la cellule hépatique pour en extraire le facteur actif.

Enfin, au sujet de l'opothérapie chez le biermérien — et bien que la question ne nous touche pas directement — il convient de citer, pour n'y plus revenir, les travaux de Castle, tant il est naturel maintenant d'unir son nom à celui de Whipple dans la question du traitement de l'anémie pernicieuse.

Si, en effet, elle est moins riche en conséquences thérapeutiques que celle de Whipple, la découverte de Castle semble

éclairer davantage la pathogénie de la maladie de Biermer et le rôle du foie dans son traitement.

On connaît les expériences de cet auteur au sujet de la gastrothérapie l'amenant à l'hypothèse de l'existence d'un principe intrinsèque contenu directement dans le suc gastrique et différent de l'acide chlorhydrique, de la pepsine et de la présure, agissant sur un principe extrinsèque provenant de l'apport alimentaire (muscle) de nature et d'existence plus discutées. Le principe antipernicieux serait donc une hormone hématopoïétique sécrétée par l'estomac et mise en réserve par le foie. De là le rôle thérapeutique du foie et le syndrome anémique observé chez les gastrectomisés totaux. Mais la gastrothérapie, en raison de la difficulté d'en standardiser l'activité, et le fait qu'étant sensible à la chaleur ne peut être effectuée par voie orale, est peu utilisée. De plus, « il n'y a aucun fait pour prouver que l'estomac de porc soit plus effectif que l'extrait de foie » (C.-P. Rhoads).

C'est donc à l'hépatothérapie, dite « méthode de Whipple », modifiée par la découverte des extraits purifiés et injectables, qu'appartient désormais — semble-t-il — le traitement de la maladie de Biermer.

Pour apprécier l'activité des extraits de foie, à un moment de leur histoire, où, cessant d'appartenir à la thérapeutique empirique, ils entrent dans la période des extractions successives et vraisemblablement de la synthèse, il paraît nécessaire de pouvoir étalonner ces extraits au moyen d'un test. Nombreux sont ceux qui ont été proposés : en est-il un qui, d'un maniement commode et courant, puisse à la fois être fidèle et sensible ? C'est ce qui a été recherché au cours de ces essais — dont l'idée ne nous est pas personnelle — et où il sera successivement étudié :

I. — Les bases cliniques et expérimentales de l'essai biologique des extraits de foie.

II. — La justification et l'exposition d'une méthode d'identification biologique.

III. — L'expérimentation personnelle à ce sujet et la discussion de la méthode.

I

LES BASES EXPERIMENTALES DE L'ESSAI BIOLOGIQUE

L'amélioration du biermérien traité par le foie, variable dans ses modalités au début, apparaît, depuis que la posologie en a été mieux fixée, se dérouler sur un mode à peu près invariable, si rapide et si régulier que d'avance on a pu établir des courbes standard de régénération (courbes d'Isaacs), dont le malade bien traité s'écarte fort peu. D'où la possibilité — semble-t-il — d'établir des tests cliniques permettant de déduire l'unité clinique sans qu'il soit nécessaire de recourir à aucun test animal. Nous allons passer rapidement en revue les avantages et les inconvénients, les justifications et les reproches de l'une et l'autre méthode. Nous étudierons ensuite, avec plus de détails, celle qui nous a retenu, et qui fut proposée par Mme Lourau au cours de travaux parus dans le *Bulletin de la Société de chimie biologique* : « L'anémie saturnine du lapin : test du facteur antipernicieux. Valeur de la méthode. Nouveau procédé de contrôle. » (Lourau, *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, t. XXV, avril-juin 1943.)

Tout d'abord, l'étalonnage ne peut se faire que sur un sujet réceptif, et non à partir du médicament lui-même, et on élimine d'emblée l'étalonnage des extraits hépatiques en partant de la quantité d'organe, car la teneur d'un extrait en principe antipernicieux varie très largement suivant des facteurs appartenant soit à l'animal dont on utilise le foie (facteur saisonnier, facteur alimentaire), soit au mode d'extraction différent selon les firmes industrielles, et même à la plus ou moins grande pureté du produit.

Comment donc se comporte un biermérien traité par l'hépathothérapie ? Une double transformation clinique et hématologique se produit dès la fin de la première semaine en général. La transformation hématologique retiendra seule notre attention quant à sa valeur de test. C'est la crise réticulocytaire qui marque le départ des phénomènes de régénération sanguine, crise précoce, et qui dépend essentiellement de deux facteurs : 1° de la quantité de substance active donnée; 2° du taux initial des hématies : la poussée sera d'autant plus forte que ce taux était plus bas (loi de Minot et Murphy). L'importance de la crise réticulocytaire est telle qu'elle précède invariablement et nécessairement la poussée globulaire. Elle semble un bon test d'activité des extraits, mais elle ne serait pas spécifique des traitements par le foie et l'estomac. La crise leucocytaire et la crise hématoblastique sont de moindre importance. La montée des hématies les suit de peu, rapide et considérable; elle se fait sans parallélisme de la montée de l'hémoglobine; il s'ensuit une chute souvent considérable de la valeur globulaire avec constitution passagère d'un syndrome hypochrome. Il faut signaler évidemment la disparition des formes anormales qui définissaient la maladie : mégaloblastes et mégalocytes font place à des hématies normales.

Du point de vue humoral, on signale aussi la baisse de l'urobiline, de la bilirubine, du potassium, alors que la lécithine et le cholestérol sanguin remontent à la normale.

Chacun de ces facteurs pourrait servir de base à l'établissement d'un test clinique. La crise réticulocytaire étant la plus constante, la plus rapidement constituée, la plus sensible et facilement mesurable, a été à l'unanimité choisie en vue de l'étalonnage. L'unité antianémique est alors définie comme « la plus petite quantité de substance qui, donnée journellement à un biermérien, produit une réponse hématopoïétique satisfaisante » (poussée réticulocytaire, augmentation du nombre des hématies et de l'hémoglobine). C'est la crise réticulocytaire qui fut choisie en 1935 par le « Council

on Pharmacy and Chemestry » des Etats-Unis pour l'essai clinique chez le biermérien.

Le biermérien en observation ne doit pas avoir d'affection compliquant l'anémie (diarrhée, artério-sclérose marquée ou accidents nerveux). Le nombre des hématies doit être compris entre 1 et 3 millions par millimètre cube, il ne doit pas y avoir de rémission spontanée, et le malade ne pas avoir reçu de transfusion récente. Il ne doit pas avoir reçu non plus de substance antianémique ou d'arsenic depuis un mois. Les réticulocytes sont comptés tous les jours et même deux fois par jour au moment de la crise maximale. Et l'on précise : « Les réponses satisfaisant à ce test doivent être obtenues sur au moins trois malades. » Depuis on pratique pour plus de commodité la « double réponse réticulocytaire » chez le même malade.

Tel est actuellement le test clinique utilisé pour l'étalonnage des extraits de foie. On conviendra facilement qu'il est peu pratique; les biermériens sont rares, plus rares encore sont ceux qui répondent à toutes les conditions cliniques et hématologiques proposées. Ce test ne répond pas à l'étalonnage industriel, ni à la recherche de laboratoire, qui actuellement se poursuivent sur de grandes échelles. Cheymol, à qui nous avons emprunté les détails de cet étalonnage, lui reproche, de plus, de ramener le malade au rôle de cobaye : fait de peu d'importance en réalité, puisqu'on ne nuit en rien au malade.

Mais surtout en ces dernières années s'est dressée l'objection la plus importante à l'étalonnage par l'essai thérapeutique chez le biermérien. Ce dernier, en effet, peut ne pas réagir à l'injection, il peut réagir de manière individuelle, enfin il peut ne réagir qu'après apport supplémentaire (transfusion). Nombreuses sont les observations de malades qui, n'ayant pas réagi à l'injection d'extrait de foie, ne présentent la crise réticulocytaire qu'après transfusion, semblant atteints d'une sorte d'hépato-résistance comparable à l'insulino-résistance, et qui ne préjuge en rien de l'activité du produit employé.

En somme, si cette méthode, comme le dit Cheymol, donne une garantie au médecin et au malade, elle n'est pas sans inconvénients. Or, quand on utilise un produit, il est normal de vouloir l'identifier auparavant. De plus, ce travail a été commencé au moment où, sous l'occupation, l'approvisionnement des fabricants d'extraits actifs était très difficile, et le doute sur la valeur des fabrications obtenues était donc encore plus plausible que sous un régime normal.

Quels sont donc les réactifs biologiques utilisés jusqu'à ce jour en vue de l'étude de l'activité des extraits hépatiques ? Existe-t-il un test biologique capable de donner un étalonnage précis ?

On éliminera rapidement quelques tests, qui, pour être intéressants, ne mettent pas en expérience des animaux en état d'anémie, tels sont : la crise réticulocytaire du cobaye normal, ou la formation de méthémoglobine qui suivrait les injections d'extraits hépatiques, ou le test de Ruysniak-Engel : retard apporté par les extraits hépatiques à la chute globulaire qui suit une injection unique de phénylhydrazine.

C'est naturellement à l'anémie expérimentale que l'on s'est adressé en cherchant la manière de la constituer qui la rapprocherait du syndrome pernicieux. Cheymol définit ainsi les qualités que doit présenter une anémie expérimentale :

1° Etre suffisamment stable sans tendance à une régénération spontanée trop rapide, et conserver les altérations sanguines caractéristiques un temps assez long pour l'étude du phénomène;

2° Etre sensible au facteur cherché : antianémique ou antipernicieux;

3° Etre pratique, c'est-à-dire s'obtenant rapidement sur un animal de laboratoire peu coûteux permettant des séries d'expériences assez nombreuses.

Avec Ch. Aubertin (1905), nous classerons les anémies expérimentales en deux grands groupes : les anémies par

soustraction ou par carence et les anémies par destruction. Nous passerons rapidement sur les anémies par soustraction répondant aux anémies par hémorragies ou par défaut d'apport alimentaire (anémies au lait) qui présentent l'avantage de ne pas léser les organes hématopoïétiques. Elles présentent pour nous le grave inconvénient de produire, pour la plupart, un syndrome hypochrome donnant d'excellents résultats quant à l'étude des ions métalliques et des acides aminés indispensables à la régénération de l'hémoglobine. Elles se rapprochent d'ailleurs assez peu du syndrome hématologique de l'anémie pernicieuse. Le facteur antipernicieux n'entre pas en jeu dans cette régénération sanguine de ces anémies simples, passagères, à régénération rapide et sans atteinte de la moelle osseuse (Damade et Léger).

Plus intéressantes sont les anémies par destruction, anémies toxiques pour la plupart. Telles sont les anémies par rayons X ou corps radioactifs, mais surtout anémies par toxiques chimiques, lesquels sont innombrables; les plus connues sont : l'anémie à la phénylhydrazine (Dervillée, *C. R. de la Soc. de biol. de Bordeaux*, 8 juin 1932, t. CX, p. 963, et 12 juill. 1932, t. CXI, p. 172); l'anémie par les acides gras (anémie hyperchrome obtenue par ingestion ou injection de sel de sodium d'acide gras non saturé); l'anémie par la saponine, par « blocage » du système réticulo-endothélial (par colloïdes électro-négatifs), par association saponine-colloïde permettant d'obtenir une anémie stable. Gottlebe recommande l'emploi de ces anémies saponine-fer colloïdal électrique ou saponine-collargol chez le lapin ou chez le rat comme test quantitatif pour l'étalonnage des préparations hépatiques; anémies par toxines microbiennes (l'achylie du biermérien permettrait la prolifération du B. perfringens, du coli, streptocoque, favorisant à leur tour les altérations sanguines); anémies par sténose intestinale, par gastrectomie; enfin des anémies spéciales à certaines espèces animales : anémie pernicieuse de la poule, anémie à Bartonnella chez le rat splénectomisé. Une seule va nous retenir

désormais, c'est l'anémie expérimentale au plomb chez le lapin. Elle présente de multiples avantages : d'une constitution facile, chez un animal commun, pouvant être anémié plusieurs fois et servir à des essais successifs, enfin répondant actuellement le mieux aux conditions qu'une anémie doit présenter pour servir de test au facteur antipernicieux, c'est-à-dire :

a) Présenter les caractères spécifiques de la maladie d'Addison-Biermer : diminution du nombre des hématies, augmentation de leur valeur globulaire et de leur diamètre, présence de mégaloblastes ou tout au moins d'érythroblastes jeunes de grande taille et à cytoplasme très basophile (Damade et Léger);

b) Guérir par les extraits hépatiques ou gastriques hautement purifiés, débarrassés le plus possible du facteur de Whipple et autres principes physiologiquement actifs. Car le principe antianémique, facteur d'hémoglobine, agissant dans les anémies banales, diffère du principe antipernicieux (Cheymol).

Toutefois, ayant terminé sa revue des nombreux tests expérimentaux de l'activité des médicaments antianémiques, Cheymol n'en termine pas moins son livre par ces mots : « En résumé, aucune anémie pernicieuse expérimentale n'a été trouvée, et le nombre des tests proposés pour la recherche et l'étalonnage de ce principe antipernicieux dans les préparations hépatiques ou gastriques prouve à lui seul le peu de valeur de ces différentes méthodes. »

C'est alors que parurent les travaux de Mme Lourau, qui jusqu'à la fin maintenant vont faire l'objet de cette étude, et dont les conclusions si nettes sont exprimées ainsi par leur auteur (*Bull. de la Soc. de Chim. biol.*, avril-juin 1943) :

1° L'anémie saturnine du lapin est un test qualitatif qui permet de rechercher le facteur antipernicieux;

2° Une méthode de contrôle individuelle, de valeur éprouvée, a été décrite.

Et dans un article publié quelques mois plus tard :

« La recherche du « seuil d'activité » permet de définir une unité-lapine, ou dose minima active, et de faire des titrages quantitatifs dont la précision atteint 1 p. 100. »

C'est à l'étude de cette méthode expérimentale, qui nous a paru interessante en dépit de cette phrase répétée dans tous les ouvrages à l'heure actuelle : « il ne reste donc comme étalonnage vrai que l'essai thérapeutique chez le biermérien », que nous allons maintenant nous attacher, en exposant la méthode et, dans un chapitre suivant, les résultats de notre expérimentation personnelle avec le lapin en état d'anémie saturnine.

II

EXPOSITION D'UNE METHODE D'IDENTIFICATION BIOLOGIQUE

Parlant de l'anémie saturnine du lapin, Cheymol semblait déjà lui avoir donné une place à part parmi les innombrables tests du facteur antipernicieux : « Actuellement, au point de vue quantitatif, seules l'anémie au plomb et l'anémie saponine-collargol, malgré les critiques que l'on peut leur faire, paraissent être utilisables dans les laboratoires industriels pour guider dans la préparation et l'estimation des extraits antipernicieux. »

L'anémie saturnine expérimentale a été essayée chez l'animal (Sabrazès, 1900; Schmidt, 1907). Elle est due à un blocage partiel de la moelle osseuse (voir Damade et Léger, *Le Sang*, 1939), entraîne une érythrolyse considérable, s'accompagne de la formation de porphyrines et guérit par le foie; ces quatre faits la rapprochent de l'anémie pernicieuse et peuvent faire espérer la possibilité d'en faire un bon test pour l'étalonnage des préparations hépatiques ou gastriques.

Voici la méthode telle que l'expose Mme Lourau dans les articles du *Bulletin de la Société de chimie biologique* précités.

Le lapin est anémié au moyen d'injections intraveineuses d'une solution d'acétate neutre de plomb dont 1 cm^3 correspond à 1 mg. de plomb métal (solution à 0 g. 188 p. 100 d'eau distillée). On procède aux injections toutes les quarante-huit heures dans la veine marginale de l'oreille en ayant soin de faire précéder chaque injection d'une numéra-

tion globulaire, d'une formule leucocytaire ainsi que d'un dosage d'hémoglobine (l'anémie obtenue étant une anémie moyenne, de l'ordre de 3.500.000, l'appareil de Hellige donne à ces dosages une précision très suffisante et des résultats qui, pour ce taux d'hémoglobine, sont superposables à ceux de la méthode au fer de Wong).

Au cours de la constitution de l'anémie, on observe une courte période suivant immédiatement les premières injections où une forte chute globulaire se produit et amène l'anémie à un état d'anémie microcytaire et hypochrome à régénération très rapide. Puis assez rapidement, en continuant les injections au même rythme (5 cm³ tous les deux jours), le taux des globules rouges remonte très sensiblement, et l'anémie se stabilise entre 3.000.000 et 3.500.000, ne présentant plus que de faibles rémissions d'une numération à l'autre, et enfin semble définitivement stabilisée autour du même chiffre lorsqu'on cesse toute injection après un total de 8 à 10 injections environ (variable suivant les sujets) représentant 40 à 50 cm³ de la solution de sous-acétate, et quinze à vingt jours de préparation. On sait qu'à l'état normal le lapin présente une formule sanguine un peu différente de la formule humaine : les globules rouges, légèrement plus petits qe ceux de l'homme, présentent une légère anisocytose et une polychromatophilie discrète. Les réticulocytes y sont normalement présents au taux de 0,3 à 3 p. 100. Enfin, l'examen des leucocytes révèle une formule à type lymphoïde. Il semble qu'il existe à l'état normal, au point de vue de la formation des globules blancs, une prédominance de l'activité des organes lymphopoïétiques sur celle de la moelle osseuse. Le taux des lymphocytes s'élève à 55 p. 100, celui des monocytes à 5 p. 100; enfin, pour les granulocytes, les pseudo-éosinophiles homologues des polynucléaires neutrophiles de l'homme, 35 p. 100; éosinophiles vrais, 1 à 3 p. 100; basophiles, 3 p. 100 (R. Copin). Au moment où l'anémie est constituée, l'animal, du point de vue sanguin, présente un syndrome le plus souvent hyperchrome et ma-

crocytaire, il y a de l'anisocytose et de la polychromatophilie plus marquées; enfin, quelques stigmates de saturnisme : hématies à granulations basophiles (hématies ponctuées). L'animal, après avoir présenté un amaigrissement assez notable les premiers jours du traitement, ne semble plus affecté par les injections après une chute de poids de 300 à 500 grammes, et la mortalité est peu élevée.

Ayant ainsi passé la période de régénération spontanée, l'animal est prêt à recevoir les injections de solutions d'extraits hépatiques. On voit qu'il est relativement facile d'obtenir des animaux ou groupes d'animaux stabilisés dans des conditions analogues, de chiffres globulaires voisins, de conditions de taille et de poids à peu près identiques (on choisit d'ordinaire l'adulte jeune de 3 kilos). Actuellement, ces animaux, insuffisamment nourris, présentent avant tout traitement anémiant un taux de globules rouges souvent inférieur à 5 millions et une hémoglobine à 70 p. 100 environ, ce qui représente une anémie déjà assez prononcée, et dont il faut tenir compte au cours des régénérations provoquées. Les injections d'extrait hépatique se font, elles aussi, par voie intraveineuse, l'extrait en solution dans du sérum physiologique étant injecté lentement. On procède alors à des examens de sang répétés de vingt-quatre en vingt-quatre heures, la régénération globulaire se manifestant parfois vingt-quatre heures après le traitement, le plus souvent quarante-huit heures, et parfois dans les cinq à six jours qui suivent, sous forme d'une importante crise réticulocytaire, d'une forte montée globulaire et d'une augmentation peu prononcée du taux de l'hémoglobine, l'organisme libérant rapidement des globules jeunes peu chargés en hémoglobine, il s'ensuit — fait important à noter dès maintenant — une chute de la valeur globulaire, chute qui persiste peu de temps et présente sa flèche de la vingt-quatrième à la quarante-huitième heure.

Il faut insister sur le fait que cette régénération ne présente ni une intensité, ni un temps de latence, ni un nou-

veau plafond globulaire qui permette en rien de préjuger de l'intensité de la régénération, ni par conséquent de l'étalonnage quantitatif de l'extrait employé. Le chiffre globulaire auquel se stabilise à nouveau l'animal se présente d'ailleurs plus ou moins élevé par rapport au taux initial, avec les variations physiologiques fréquentes chez le lapin. Tout ceci est facteur des réactions individuelles chez le sujet, et par conséquent de peu de valeur.

En présence de l'anémie ainsi constituée, de quelle manière peut-on l'utiliser pratiquement en vue de l'étalonnage ? Au cours de ses différents travaux, Mme Lourau nous en présente trois, qui sont plutôt les trois différentes étapes de la mise au point de la même méthode. Dans la *Presse* médicale du 28 juillet 1937, elle nous présente les courbes comparées d'animaux préparés au plomb dans des conditions analogues et recevant des injections d'extrait hépatique, et d'animaux anémiés témoins ne recevant pas d'injection. Il est remarquable de constater le parallélisme de courbes de régénération chez les animaux recevant des extraits de foie et chez lesquels la montée globulaire s'effectue après un temps de latence plus ou moins long, de manière à se stabiliser à un niveau élevé et dont on compare les chiffres moyens, l'animal témoin demeurant en palier autour de 3.500.000, chiffre auquel s'était stabilisée l'anémie, et auquel l'animal non traité demeurerait pendant deux à trois mois.

Actuellement, si cette méthode paraît fidèle, elle n'en est pas moins incommode tant à cause du nombre d'animaux à mettre en expérience que de la difficulté matérielle des nombreux examens qu'elle nécessite et du prix de revient. C'est pourquoi, dans un article récent (*Bull. Soc. de chim. biol.*, avril-juin 1943), Mme Lourau propose une méthode individuelle mettant en expérience un seul animal anémié comme précédemment par une série d'injections de plomb arrivant au total de 40 mg. environ et représentant une anémie stable. Ceci permet, entre autres avantages matériels, d'éliminer l'hépato-résistance ou l'instabilité de certains sujets qui,

comme chez l'homme, peut se manifester, bien que le fait soit rare. Le lot des animaux témoins est désormais inutile, et les mêmes animaux peuvent être anémiés plusieurs fois et servir ainsi à plusieurs essais, car après régénération sous l'influence de l'extrait étudié, l'animal, sous l'influence d'une nouvelle injection de plomb, présente la même sensibilité, et permet, par une série de courbes superposables, la comparaison des différents extraits.

Toutefois, des difficultés matérielles rendent malaisées les séries trop nombreuses d'expériences chez le même animal : la thrombose des veines auriculaires par le plomb s'effectue rapidement, et les animaux ne peuvent supporter indéfiniment une anémie aussi sévère. Telle quelle, cette méthode présente de grands avantages : elle semble remarquablement fidèle. Les différents animaux et les différents essais sur le même animal présentent un parallélisme remarquable, et sa simplicité en fait un instrument de comparaison de maniement bien facile : un seul animal préparé par une dizaine d'injections de 5 cm^3 environ (quelques variations individuelles) de sous-acétate de plomb. Toutefois, cette méthode restait purement qualitative et ne permettait que par comparaison l'étalonnage cherché de la préparation hépatique. Répétons que cette comparaison s'avère facile et que le test n'en conserve pas moins toute sa valeur : « On considère comme active toute solution qui donne un résultat positif avec au moins deux animaux. »

Toutefois, les deux méthodes précédentes — on le voit — sont purement comparatives, c'est pourquoi leur auteur, quelques mois plus tard, en propose une troisième destinée à pallier aux inconvénients des deux premières : il s'agit ici d'une méthode quantitative, d'une méthode ne demandant plus la constitution lente et parfois dangereuse d'un saturnisme prolongé et grave. Nous verrons cependant au chapitre de l'expérimentation que, pour en être plus élégante, la méthode ne soulève pas moins un certain nombre d'objections assez sérieuses quant à l'efficacité absolue de test quan-

titatif qui lui a été donnée. Ceci tient, non pas au fait qu'il s'agit d'un test quantitatif, mais aux conditions nouvelles de l'expérimentation, et surtout le fait qu'on expérimente en période d'anémie encore instable. Quoi qu'il en soit, il convient d'étudier en détails un procédé à la fois simple et intéressant.

Il a déjà été signalé qu'au cours de la constitution de l'anémie saturnine succédait à une courte phase de syndrome hypochrome et microcytaire un passage, d'ailleurs assez brusque, à l'hyperchromie assez élevée de l'ordre de 1,2 à 1,5. C'est cette phase immédiatement après le début de la constitution de l'anémie qu'utilise Mme Lourau au cours de ses expériences, sans attendre la stabilisation de l'anémie, laquelle ne serait plus nécessaire à la mesure de la régénération sanguine. C'est donc en pleine phase des rémissions spontanées que l'on fait les essais, rémissions qui, à cette période, sont encore rapides, totales et stables. Comment différencier alors la rémission spontanée de la régénération due à l'injection de la solution hépatique ? Par l'abaissement notable de la valeur globulaire, répond Mme Lourau. Nous avons déjà mentionné, en effet, que parmi les phénomènes sanguins qui marquent le début de la régénération se produit une chute de la valeur globulaire due à la mise en circulation par la moelle d'éléments encore peu chargés en hémoglobine, mais assez nombreux pour entraîner une montée en flèche du taux des globules rouges; désormais seule entrerait en ligne de compte le chiffre de l'abaissement de la valeur globulaire sans qu'intervienne le nombre des hématies. Comment attribuer cet abaissement de la valeur globulaire à l'activité antipernicieuse ? La chute au cours de la régénération spontanée qui ne serait pas constante serait toujours faible et ne dépasserait jamais le chiffre de 0,14 à 0,15; elle serait, de plus, indépendante de la valeur globulaire initiale; car, fait important, au cours de l'expérimentation, les chutes de la valeur globulaire après injection de foie sont rapidement croissantes avec la valeur globulaire initiale et

permettraient ainsi une différenciation nette d'avec les chutes spontanées pour des valeurs de départ assez élevées. Nous verrons que l'expérimentation personnelle nous permet de mettre en doute une différence si nette entre les chiffres d'abaissement de la valeur globulaire au cours de la régénération spontanée et au cours de la régénération provoquée, ce qui diminue bien l'absolue sécurité de la méthode quand on la pratique en cours de constitution de l'anémie. Comment se poursuit le dosage ? Le « blocage » de la moelle étant ainsi réalisé par des doses de plomb minimes et identiques (ce qui évidemment donne de la rapidité à l'expérience et la rend moins dangereuse), on amène par une injection d'extrait à dilution précise une libération d'hématies jeunes provoquant un abaissement important de la valeur globulaire et croissant en fonction de la valeur globulaire initiale. Le principe du titrage consiste alors dans la recherche du seuil d'activité « pour des dilutions à des taux très nettement différents, et dont la précision est de l'ordre de 1/100 ». La constance de ce seuil serait indépendante de l'animal qui a servi à le définir (quel que soit son état d'anémie, les doses de plomb qu'il a reçues, la date, l'hyper ou l'hypochromie de l'anémie), bien que, comme il a été rapporté, la valeur de l'abaissement est fonction de l'hyperchromie initiale. Cette chute de la valeur globulaire se produit rapidement, dans les deux à trois jours qui suivent l'injection et se fait en flèche, ne persistant pas au-delà de vingt-quatre heures, phénomène que l'on constate constamment au cours de toutes les expériences.

C'est alors que l'auteur standardise les extraits hépatiques, et définit l'unité-lapin : « plus petite dose donnant une réaction positive; le titre d'une solution est égal à l'inverse de la dernière solution active, lorsque cette dilution est injectée sous le volume de 1 cm^3. »

Pratiquement, les injections se font à des dilutions comprises entre 1/100 et 1/400, cette dernière donnant elle aussi, pour un extrait actif, une chute appréciable de la valeur

globulaire; nous ne l'avons toutefois pas trouvée supérieure à 0,14 à ce taux de dilution, mais le chiffre de la valeur globulaire initiale chez des animaux anémiés depuis déjà assez longtemps n'excédait pas 0,68, et par conséquent était insuffisant pour obtenir des chutes importantes. Mme Lourau recommande d'ailleurs, à juste raison, d'utiliser pour les dosages des sujets de valeur globulaire au moins égale à 0,7 et de préférence supérieure à 1, la quantité de plomb injectée étant absolument sans importance à son avis, et il est rare de ne pas trouver d'animaux ne présentant pas, au cours des injections de plomb, une phase d'hyperchromie prononcée. C'est au cours de cette phase seulement que la chute des valeurs globulaires se manifeste avec toute son intensité et avec des valeurs parfois considérables.

C'est dans ces conditions d'expériences suivies pas à pas, et réalisées comme elles ont été exactement décrites, qu'ont été effectués les quelques courbes et chiffres qui vont suivre, utilisant pour nos dosages les instruments de laboratoire les plus usuels : pipettes et hématimètre de Malassez, hémoglobinimètre de Hellige.

III

EXPERIMENTATION

Nous avons utilisé plusieurs animaux (Mme Lourau, 18 lapins; nous-même, 10), qui ont été mis en expérience et soumis à des examens répétés; il a été procédé aussi à des séries d'expériences chez le même animal. La première préccupation a été d'obtenir une anémie stable à régénération spontanée pratiquement inexistante (on sait que les petites variations fréquentes sont normales chez le lapin). Il a été retrouvé à chaque série d'expériences les résultats signalés par Mme Lourau : soit une moyenne de 8 à 10 injections de 5 cm³ de solution d'acétate neutre de plomb à 0,188 p. 100 faites tous les deux jours pour obtenir le degré d'anémie cherché. La stabilisation obtenue l'a été à un chiffre un peu plus bas (3.400.000 environ) que celui trouvé par l'auteur (3.800.000); sans doute, nos lapins présentaient-ils un certain degré d'anémie initial qui nous a toujours gêné au cours de ces travaux.

Ayant ainsi éliminé la régénération spontanée des premiers jours, il fut procédé aux injections de solutions d'extraits actifs. Ces injections furent faites quarante-huit heures après une injection intraveineuse de 1 cm³ de sérum physiologique servant de contrôle. Enfin, deux ordres d'expérience ont été poursuivis : solutions à des dilutions identiques de produits différents (Hépagyl, Campolon, Hépatrol, Pernaemyl au 1/100), puis des injections du même produit à des taux de dilution progressivement croissants : 1/100, 1/200, 1/400, afin de définir le seuil d'activité. Il eût été

intéressant d'étudier l'activité d'extraits préparés au Laboratoire (1), les extraits aqueux se fabriquant facilement. Laissant intentionnellement de côté l'étude de phénomènes tels que la crise réticulocytaire, la réaction leucocytaire, l'étude des organes hématopoïétiques qui, s'ils sont intéressants à étudier au cours de la régénération, n'en constituent pas moins des facteurs étrangers à notre test et qui ont fait l'objet de nombreux travaux relatifs à l'anémie expérimentale du lapin.

C'est donc le double point de vue de l'élévation du taux des globules rouges et de l'abaissement de la valeur globulaire sous l'effet de l'injection d'extraits actifs qui fera seul l'objet de ces schémas.

Voici quelques chiffres pris au hasard des animaux mis en expérience et qui illustrent : 1° la manière de constituer une anémie stable; 2° la montée des hématies et la chute de la valeur globulaire au cours des régénérations provoquées par l'extrait à essayer. (La chute de la valeur globulaire est en général plus rapide et se fait en flèche, la montée du taux des hématies est plus lente à se constituer et demeure en plateau.)

1° Lapine n° 84 (Poids : 2 kg. 950) mise en expérience le 24 février 1945.

	Hellige	G. R.	V. G.	Injections
	—	—	—	—
24 février	52 %	4.020.000	0,65	5 cm³ Pb
27 février	45 %	2.880.000	0,80	5 cm³ Pb
2 mars	47 %	2.360.000	1 »	5 cm³ Pb
5 mars	42 %	3.400.000	0,62	5 cm³ Pb
6 mars	45 %	3.220.000	0,70	5 cm³ Pb
10 mars	47 %	3.260.000	0,67	5 cm³ Pb
12 mars	42 %	3.280.000	0,65	5 cm³ Pb
14 mars	41 %	3.020.000	0,68	5 cm³ Pb
17 mars	45 %	3.180.000	0,7	1 cm³ sérum physiolog.
19 mars	42 %	3.100.000	0,67	2 cm³ Hépatrol au 1/100
20 mars	43 %	3.380.000	0,64	Rien
21 mars	42 %	3.440.000	0,61	—
22 mars	47 %	3.760.000	0,68	—

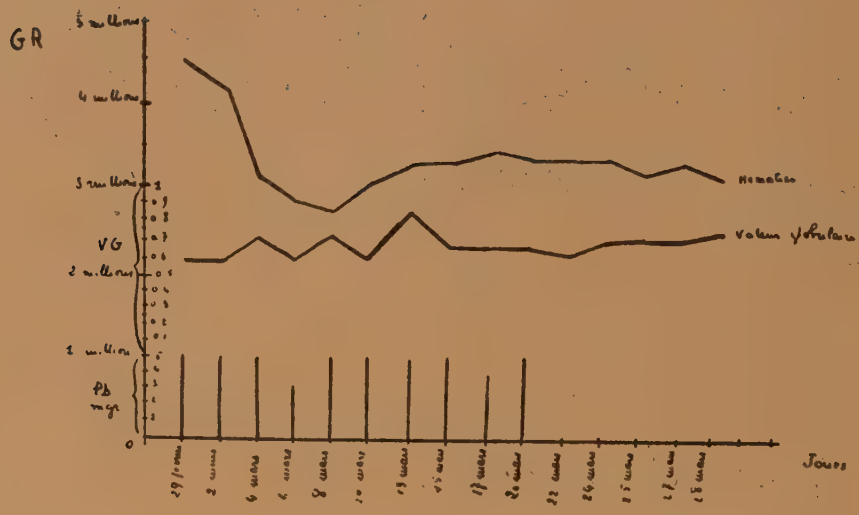
(1) L'abattoir de Bordeaux était atteint de carence carnée !

2° Lapine n° 26 (Poids : 2 kg. 100).

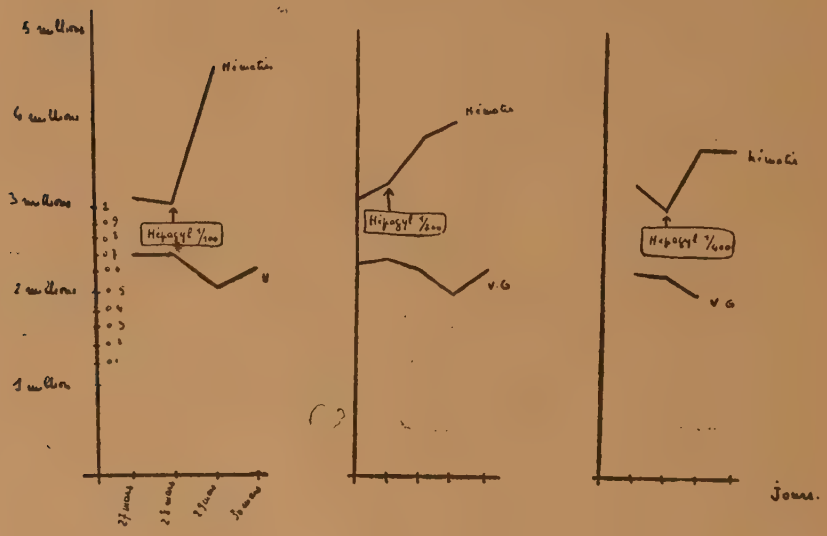
	Hellige	G. R.	V. G.	Injections
	—	—	—	—
28 mars 1945....	64 %	5.340.000	0,60	5 cm³ Pb
30 mars	42 %	3.180.000	0,67	5 cm³ Pb
3 avril	42 %	3.700.000	0,56	5 cm³ Pb
5 avril	50 %	3.280.000	0,7	5 cm³ Pb
7 avril	42 %	3.120.000	0,67	5 cm³ Pb
9 avril	39 %	3.060.000	0,60	5 cm³ Pb
10 avril	46 %	3.100.000	0,70	1 cm³ sérum physiolog.
12 avril	48 %	3.240.000	0,70	2 cm³ Hépagyl au 1/100
13 avril	48 %	3.560.000	0,60	Rien
14 avril	50 %	3.960.000	0,64	—
16 avril	54 %	4.520.000	0,60	—
17 avril	54 %	4.480.000	0,60	—

Le graphique ci-joint illustre de même la montée du taux des hématies de manière stable et la chute passagère de la valeur globulaire sous l'influence de l'extrait de foie. Dans le premier graphique, on assiste à la constitution de l'anémie stable.

Dans la constitution du deuxième graphique, on étudie l'action de l'Hépagyl en dilution au 1/100, 1/200, 1/400, on est parti chaque fois d'un animal en état d'anémie stable, préparé par les injections de plomb aux doses et dates indiquées par le premier graphique. On voit que chaque fois l'animal stabilisé à 3.400.000 globules environ a subi tantôt en vingt-quatre, tantôt en quarante-huit heures, la montée globulaire et la chute de la valeur globulaire caractéristiques l'amenant à 4.400.000 pour l'injection au 1/100, à 4.100.000 en quarante-huit heures pour l'injection au 1/200, à 3.800.000 au 1/400. Il faut mentionner qu'au départ, avant toute injection, le taux des globules rouges était de 4.500.000 (graphique 1). Quant aux valeurs globulaires, parties chaque fois d'un chiffre voisin de 0,7, l'abaissement s'est fait à 0,55 pour l'injection au 1/100, 0,60 au 1/200, 0,62 au 1/400. Ces chiffres, on le voit, sont un peu inférieurs en valeur absolue à l'abaissement de 0,14 réclamé par Mme Lourau pour les distinguer des chiffres d'abaissement des rémissions spontanées, mais nous sommes ici en période d'anémie stable où la valeur globulaire conserve une valeur quasi constante, et où la régénération



Lapin 20 : constitution d'une anémie stable au 30e jour de plomb



spontanée est hors de cause. Ces abaissements, quel que soit leur écart avec la valeur initiale, sont donc valables, et l'expérimentation sur des animaux de valeur globulaire de départ supérieure à 1 nous a donné des chiffres comparables à ceux de Mme Lourau, c'est-à-dire avec des chutes supérieures à 0,15. Mais il ne nous semble pas indispensable que l'écart soit supérieur à 0,15, étant donné, nous le répétons, qu'en période d'anémie stable constituée, la valeur globulaire s'est toujours montrée très stable elle aussi.

Avec d'autres produits que l'Hépagyl il a été obtenu de même des résultats superposables et des courbes analogues. On a injecté à différents animaux des dilutions d'extraits, tels que Campolon, Hépatrol, Pernaemyl et Hépagyl.

Voici le tableau des chiffres correspondant aux graphiques ci-dessus :

LAPIN N° 10.

	Hb	G. R.	V. G.	Injections
	—	—	—	—
29 février 1944	55 %	4.440.000	0,62	5 cm³ Pb
2 mars	55 %	4.280.000	0,63	5 cm³ Pb
4 mars	45 %	3.140.000	0,72	5 cm³ Pb
6 mars	35 %	2.900.000	0,60	3 cm³ Pb
8 mars	42 %	2.840.000	0,73	5 cm³ Pb
10 mars	37 %	3.040.000	0,61	5 cm³ Pb
13 mars	50 %	3.280.000	0,78	5 cm³ Pb
15 mars	42 %	3.220.000	0,65	5 cm³ Pb
17 mars	46 %	3.460.000	0,67	4 cm³ Pb
20 mars	45 %	3.280.000	0,68	5 cm³ Pb
22 mars	42 %	3.360.000	0,62	1 cm³ sérum physiolog.
24 mars	45 %	3.320.000	0,68	Rien
25 mars	45 %	3.040.000	0,75	—
27 mars	45 %	3.280.000	0,70	—
28 mars	45 %	3.080.000	0,70	1 cm³ Hépagyl au 1/100
29 mars	49 %	4.420.000	0,55	—
3 avril	58 %	3.420.000	0,76	1 cm³ Hépagyl au 1/200
4 avril	50 %	3.820.000	0,66	Rien
5 avril	50 %	4.100.000	0,60	—
19 avril	41 %	3.000.000	0,68	Hépagyl au 1/400
20 avril	46 %	3.700.000	0,62	Rien
21 avril.	46 %	3.620.000	0,63	—

Une constatation assez importante a pu être faite au cours de ces différentes manipulations : on voit que lorsqu'on se maintient en état d'anémie stable, les résultats énoncés par

Mme Lourau ont été retrouvés, et facilement reproduits au cours de chaque expérience. Les résultats ont semblé plus discutables quand il s'est agi d'injecter l'extrait actif sans attendre la constitution définitive de l'anémie, en période de rémission spontanée; le test serait alors, d'après Mme Lourau, comme il a été fait mention plus haut, l'abaissement à la fois notable et durable de la valeur globulaire, à un chiffre dépassant 0,14. Il nous est arrivé cependant d'observer chez des animaux ayant reçu chacun 3 injections de plomb et présentant des valeurs globulaires de l'ordre de 1 et 1,3 de trouver, en laissant les animaux sans traitement, une chute spontanée, la valeur globulaire atteignant en quarante-huit heures les chiffres de 0,62 et 0,70, soit une différence de 0,28 pour l'un et 0,33 pour l'autre. Sans doute, ne s'agit-il que des chiffres de la rémission spontanée, et les chiffres de la rémission provoquée se seraient-ils montrés supérieurs quant à l'écart obtenu. Mais cela suffit pour éliminer la valeur absolue du chiffre 0,14 en tant que caractéristique de la régénération provoquée. Il nous a donc semblé assez aléatoire d'expérimenter en période de rémission spontanée; la méthode était élégante, ne nécessitant qu'une dose de plomb et qu'une série de manipulations minimes, mais infiniment moins sûre que le titrage effectué en période d'anémie constituée et durable, plus dangereuse certes pour l'animal, de lecture plus lente à obtenir, puisque le réactif animal demande une plus longue préparation, mais éliminant sûrement les chutes souvent considérables de la valeur globulaire au cours des régénérations spontanées qui suivent des injections de plomb trop minimes.

La méthode nous paraît cependant conserver sa valeur — effectuée selon les mêmes principes — tant en fait de test qualitatif (par comparaison du taux des globules rouges et de la valeur globulaire au cours des différents essais) que peut-être comme test quantitatif (par la recherche du seuil d'activité des extraits hépatiques). Toutefois, il semble bien que l'on doive ajouter : l'étalonnage doit se faire chez un animal en état d'anémie saturnine d'invariance contrôlée et durable. (Il faut revenir sur le fait qu'on l'obtient assez vite, et presque cons-

tamment, avec une dizaine d'injections réparties sur vingt jours.)

Dès lors, on peut adopter comme valables les conclusions de Mme Lourau : « La chute de la valeur globulaire — qui se produit, selon le sujet, au bout de deux, trois à quatre jours lorsque l'injection est faite intraveineuse — ne dure généralement que vingt-quatre heures, et son intensité est moindre qu'avec des doses deux ou plusieurs fois supérieures. Il est donc possible de titrer quantitativement l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques et ,partant, de les standardiser. »

L'auteur ayant défini l'unité-lapine comme on l'a écrit, établit alors l'équivalence entre cette unité biologique et l'unité clinique définie par les Américains.

Déjà, Gottlebe avait émis l'opinion que l'anémie saturnine, étant une anémie à régénération très rapide, ne pouvait servir de test pour l'étalonnage du principe antipernicieux, et Mme Lourau lui opposait : « la phase de déglobulisation correspondant aux premières injections de plomb à régénération très active, et la phase où, par traitement prolongé, on voit le chiffre globulaire se relever et atteindre une valeur moyenne pour ne plus offrir qu'une faible tendance à des variations spontanées. » Il semble bien, en effet, que l'on doive s'en tenir à l'expérimentation en période d'anémie stable, bien que le chiffre des valeurs globulaires, moins élevé à la période d'anémie constituée qu'au début, offre une chute moins spectaculaire au lendemain de l'injection, mais de signification tellement plus certaine.

Ayant ainsi discuté pas à pas l'exactitude et la valeur de ce test, ses limites aussi, il nous reste, avant de conclure, à soulever les quelques objections d'ordre plus général qui s'attachent à la méthode elle-même, et non plus à ses modalités expérimentales. On lui a reproché d'être un test de la valeur antianémique de l'extrait étudié, mais non un test du facteur antipernicieux. On sait, en effet, que le facteur de Whipple ne s'est pas toujours éliminé totalement au cours des purifications que subissent les macérations hydro-alcooliques de

foie. Ces dernières peuvent conserver, d'après Whipple, jusqu'à 10 p. 100 du pouvoir de régénération manifesté par l'organe total. Disons seulement que la méthode s'est montrée fidèle avec les extraits les plus purifiés que l'on connaisse actuellement, et qu'il se peut qu'elle le demeure au cours des purifications plus poussées que l'on effectuera.

D'ordre encore plus général est la dernière objection : l'anémie expérimentale proposée n'est pas superposable à la maladie de Biermer, tant du point de vue clinique que du point de vue hématologique, on n'y a jamais retrouvé en particulier que des macrocytes et non des mégalocytes caractéristiques de l'affection humaine (Damade et Léger). Il semble cependant, à l'heure actuelle, que l'anémie saturnine soit une des meilleures anémies expérimentales quant à son efficacité comme test biologique; elle est, en tout cas, l'une des plus facilement réalisables, ce qui est intéressant en vue de l'étalonnage des préparations industrielles. De plus, si elle est bien — comme nous l'espérons — sensible au facteur antipernicieux, importe-t-il qu'elle soit rigoureusement superposable à la maladie de Biermer ? Le Professeur R. Hazard ne dit-il pas : « Pour juger de l'activité des différents produits isolés du foie ou de l'estomac, il fallait disposer d'une technique sûre permettant de reproduire expérimentalement une anémie dont les caractères fussent aussi voisins que possible de ceux de l'anémie humaine à traiter. Sans doute aucune technique ne permet-elle d'atteindre l'identité entre ces deux formes. Mais n'est-ce pas là un fait général ? Est-il vraiment donné souvent de réaliser chez l'animal, pour la traiter, une affection identique à celle que l'on observe chez l'homme malade ? Les principes actifs de la digitale, par exemple, ont-ils été déterminés d'après leurs effets chez le chien en état d'insuffisance cardiaque provoquée ? Imparfaites par conséquent, mais combien précieuses cependant, les méthodes qui ont permis de produire chez l'animal tant de variétés d'anémie par carence ou par intoxication. Toutes ont apporté un fait intéressant du point de vue de l'étiologie ou de la thérapeutique d'une affection polymorphe. »

CONCLUSIONS

I. — Parmi les très nombreux tests biologiques proposés pour l'étude du facteur antipernicieux, l'anémie saturnine du lapin nous a paru l'un des plus intéressants, non tant par ses caractères hématologiques qui la rapprochent mal de l'anémie humaine que par sa facilité et sa régularité d'obtention, que par sa sensibilité enfin aux injections d'extraits pratiquées en vue de l'étude de la régénération sanguine.

II. — Les essais pratiqués surtout par comparaison de courbes obtenues soit dans l'augmentation du taux des hématies, soit dans l'abaissement brutal de la valeur globulaire, nous ont fourni un résultat suffisamment constant pour admettre la valeur de cette méthode comme test d'action des extraits hépatiques injectables.

III. — Il apparaît possible de définir une Unité-Lapin, quoique nos essais personnels, insuffisants en nombre, ne nous permettent pas de conclure à la valeur quantitative de la méthode.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et, s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, et si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

VU, BON A IMPRIMER :
Le Président,
DAMADE.

VU : *Le Doyen,*
DUPÉRIÉ.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Bordeaux, le 23 avril 1945.
Le Recteur de l'Académie.
A. MARCHAUD.

BIBLIOGRAPHIE

Arthus (A.), Lourau (M.) et de Sacy (G.-S.). — C. R. de la Soc. de biol., 1934, 117, 861-863; 1935, 120, 583-584; 1938, 128, 512-514; 1939, 130, 642-644.

— *Le Sang*, 1935, 9, 226-242.

— Tests biologiques des principes antianémiques contenus dans le foie. *Presse médicale*, 1937, 1102-1105.

Cheymol (J.). — Médicaments antianémiques et anémies expérimentales. Collection pratique médicale, Paris, 1940, Masson et Cie, édit.

Copin (R.). — L'anémie expérimentale du lapin. Thèse Bordeaux, 1936.

Council on Pharmacy and Chemistry. *Journ. of Amer. Med. Assoc.*, 1935, 105, 1269.

Damade et Léger. — Etat actuel du traitement des anémies pernicieuses. *Journ. de méd. de Bordeaux*, n^{os} 36-37, 3-10 sept. 1938, p. 186 et suiv.

— Intérêt de l'étude de la moelle osseuse dans les anémies expérimentales du lapin. Soc. franç. d'hématologie, 5 mai 1939, in *Le Sang*, t. XIII, n° 6, 1939, p. 694-699.

Europe médicale, 1939 (n° 10) : L'anémie pernicieuse.

Isaacs (R.) et collab. — Etalonnage. Anémie pernicieuse pour l'augmentation des globules rouges après la thérapeutique par le foie et l'estomac. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1938, 111, 2291.

Loëffler (Prof.). — Considérations sur l'anémie de Biermer.

Lourau (M.). — L'anémie saturnine du lapin, test du facteur antipernicieux. Valeur de la méthode. Nouveau procédé de contrôle. *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, t. XXV, avril-juin 1943, n^{os} 4-6.

LOURAU (M.). — Standardisation de l'activité antipernicieuse des extraits hépatiques par une méthode biologique. *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, t. XXV, oct.-déc. 1943, nos 10-12, p. 393.

MINOT, COLIN, MURPHY and LAWSON. — *Amer. Journ. of Med. Sc.*, 1928, 175, 599, 622.

RHOADS (C.-P.). — Le traitement moderne de l'anémie pernicieuse. *Ann. de thérapie biologique*, 1938, p. 387 et suiv.

SÉRIEYS (P.). — Considérations sur un nouvel extrait de foie injectable et sur le contrôle d'efficacité du produit dans l'anémie de Biermer. Thèse Bordeaux, 1944.

WEIL (Prof. Emile). — Notes sur l'anémie de Biermer.

WEST. — *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1940, vol. 115, n° 1, p. 39.

Bordeaux, n° 847. — Dépôt légal effectué en 1945 (2e trimestre).

23385. — Imprimeries Delmas, Bordeaux, 31.0192. — 1945.